

Kinga Wilkus, MSc

**The influence of tumor microenvironment on the activity and
gene expression profile of organospecific endothelial cells**

**Dissertation for the Doctor of medical sciences and health sciences in
medical sciences**

Supervisor: Claudine Kieda, prof., PhD, DSc

Co-Supervisor: Klaudia Brodaczewska, PhD

Military Institute of Medicine-National Science Centre, Laboratory of
Molecular Oncology and Innovative Therapies



The doctoral dissertation defense submitted to
Medical Sciences Discipline Board of the Medical University of Warsaw

Warsaw, 2023

Streszczenie

Wstęp: Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych wśród żeńskiej populacji na całym świecie, będąc przyczyną śmierci tysięcy kobiet. Dlatego tak istotne jest zrozumienie procesu wzrostu guza, jego progresji i formowania przerzutów. Angiogeneza- proces, w którym komórki śródbłonka (ECs- ang. *endothelial cells*) odgrywają kluczową rolę- nie przebiega prawidłowo w przypadku patologicznej tkanki w porównaniu do zdrowej tkanki, co stanowi jedną z głównych cech raka (ang. *hallmark of cancer*). Nadrzędnym celem projektu jest scharakteryzowanie organospecyficzności komórek śródbłonka wynikającej z mikrośrodowiska guza, poprzez określenie globalnego wzoru ekspresji genów oraz ocenę tkankowo-specyficzną odpowiedzi oraz aktywności ECs pochodzących z guza w porównaniu ze zdrowym śródbłonkiem.

Metodologia: W ramach realizacji projektu, badania koncentrowały się na komórkach wchodzących w skład i kształtujących mikrośrodowisko guza w trakcie choroby, tj. komórkach śródbłonka, ponieważ są one odpowiedzialne za angiogenezę. Do eksperymentów wykorzystano unikalny model organospecyficznym komórek śródbłonka, wyizolowanych ze zdrowej tkanki i guza pierwotnego, pochodzących od tej samej pacjentki z rakiem piersi. Komórki te unieśmiertelniono w określonych warunkach, zachowując ich charakterystyczny fenotyp śródbłonkowy, zarówno pod względem cech, funkcji i pochodzenia tkankowego. Komórki hodowano *in vitro* w warunkach normoksji (21% pO₂) oraz hipoksji (1% pO₂). Do oceny wpływu organospecyficzności na aktywność komórek śródbłonka wykorzystano test funkcjonalny tworzenia pseudonaczyń. Ponadto, użyliśmy testu żywotności komórek, aby porównać stopień proliferacji w standardowych warunkach hodowli między zdrowymi i patologicznymi komórkami śródbłonka. Za pomocą cytometrii przepływowej i metody Western blot scharakteryzowaliśmy fenotyp ECs i ekspresję wybranych cząsteczek na poziomie białka. Aby określić, w jaki sposób mikrośrodowisko wpłynęło na ważne cząsteczki, takie jak wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego A (VEGF-A- ang. *vascular endothelial growth factor A*) przez komórki śródbłonka, zmierzono poziom wydzielanego VEGF-A w pożywce hodowlanej za pomocą testu ELISA. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS- ang. *next generation sequencing*) całego transkryptomu, umożliwiło zidentyfikowanie kluczowych genów, które są modulowane przez mikrośrodowisko guza. Określono profil ekspresji genów, który charakteryzuje komórki patologiczne

w porównaniu ze zdrowymi komórkami śródbłonka.

Wyniki: Dokonano przeglądu aktualnej wiedzy na temat komórek śródbłonka, ich organospecyficzności i plastyczności. Przedstawiono w jaki sposób śródbłonkowe komórki progenitorowe/komórki prekursorowe śródbłonka oraz dojrzałe komórki mogą być wykorzystane w badaniach *in vitro*: w modelach 3D i łączonej hodowli z innymi komórkami w celu wytworzenia bariery krew-mózg (BBB-ang. *blood brain barrier*). Podsumowano rolę komórek śródbłonka w angiogenezie i chorobach. W oryginalnej pracy przeprowadzono, przy użyciu sekwencjonowania transkryptomu, globalną charakterystykę genów nowego modelu komórkowego i zidentyfikowano najbardziej rozregulowane geny oraz procesy biologiczne. Patologiczne ECs charakteryzowały się wzrostem *Ephrin-B2* i *SNCAIP*, co wskazuje na ich mniejszą dojrzałość, a także obniżoną ekspresją CD31, markera ECs. Zbadano inne białka charakterystyczne dla śródbłonka naczyń (ACE+, VWF+) i markery ich różnicowania (CD31+, CD 133+, CD105+, CD34). Pokazaliśmy, że ich ekspresja była obniżona w śródbłonku pochodzącym z guza. Ponadto patologiczne ECs miały obniżony poziom białek adhezyjnych (ICAM-1+, VCAM-1+, CD62-L+) oraz białek tworzących barierę, takich jak ZO-1+. Za pomocą testów funkcjonalnych, testu tworzenia pseudonaczyń i testu przepuszczalności, potwierdziliśmy różnice między obiema liniami komórkowymi, na co wskazywał również zwiększony poziom VEGF-A uwalniany w odpowiedzi na niskie pO₂. Dane z NGS wskazały geny zaangażowane w przebudowę macierzy pozakomórkowej (ECM-ang. *extracellular matrix protein*): kolageny, lamininę, fibronektynę i integrynę (ITGB6), które uległy deregulacji w ECs pochodzących z guza piersi. To dodatkowo potwierdza patologiczną angiogenezę HBCa.MEC wykazaną w testach funkcjonalnych. Innym procesem zmienionym w patologicznym śródbłonku było przejście endotelialno-mezenchymalne (EndoMT) związane z reorganizacją macierzy pozakomórkowej spowodowaną rozregulowaniem genów: *SPPI*, *ITGB6*, *COL4A4*, *ADAMST2*, *LAMAI*, *GAS6*, *AGTR2*, *PECAMI*, *ELN*, *FBLN2*, *COL6A3*, *COL9A3*. Profil ekspresji genów przebudowujących ECM sugerował, że nowotworowe ECs nabywają właściwości migracyjnych, co zostało potwierdzone testem funkcjonalnym – testem gojenia się ran (dane nieprzedstawione, znajdują się w przygotowanej do opublikowania kolejnej pracy naukowej).

Wnioski: Scharakteryzowany unikalny model ECs pochodzących z piersi- zdrowej i patologicznej tkanki, wskazuje na konieczność wykorzystywania odpowiednich modeli komórkowych do prowadzenia biologicznie istotnych badań *in vitro*. Komórki

śródbłónka z guza w porównaniu ze zdrową odpowiadającą tkanką różniły się fenotypowo i funkcjonalnie. Dzięki temu modelowi, określono nie tylko wpływ mikrośrodowiska guza i zdolności adaptacyjnych ECs, ale także ich interakcje z komórkami zrębu. Wskazano na komunikację między komórkami śródbłónka a mikrośrodowiskiem, które ma kluczowe znaczenie dla rozwoju guza: oprócz zakłócania angiogenezy, mikrośrodowisko guza zmienia fenotyp w patologicznych EC poprzez indukcję EndoMT.